

アスパラガス属植物葉緑体DNAの構造解析及びRFLP によるそれらの系統関係

著者	李 榮玉
号	511
発行年	1995
URL	http://hdl.handle.net/10097/17001

論 文 内 容 要 旨

第1章 序論

食用アスパラガスとして知られている *Asparagus officinalis* L. は、雌雄異株植物で種子で繁殖し、それらの雌雄性比は1:1である。この性分化は、性染色体のXとY遺伝因子により支配され、XX型が雌株植物になり、XY型が雄株植物になる。この食用アスパラガスの雌雄の花の構造を比較してみると、雌花の中に雄蕊の退化が、雄花の中に子房の退化が見られ、その雄花と雌花の早期発生段階には子房と雄蕊の両方を持っているが、性が分化する段階では雄は雄蕊のみを、雌は子房のみを発達させる。この食用アスパラガスの性染色体は同質性が高く、進化の過程で、最近、性分化が起こったと考えられている (Dellaporta and Calderon-Urrea 1993)。

Asparagus officinalis L.が含まれるアスパラガス属植物は、単子葉植物のユリ科に属する多年生植物であり、主に旧大陸 (アフリカ、アジア、ヨーロッパなど) の乾燥地に分布し、約100種から300種を含んでいる。それらの種の中には、雌雄異株と両性花の種があり、数種が雌雄異株植物で大部分が両性花植物である。地理的な分布と雌雄性の分化との関係を見ると、両性花植物の原産地は南アフリカが多く、雌雄異株植物の原産地はアジア、ヨーロッパが多い。このアスパラガス属植物の雌雄性の分化は、食用アスパラガスの花の構造をみると、雌花の中に雄蕊の痕跡が雄花の中に子房の痕跡があり、両性花の植物から進化の過程で雌雄異株植物が分化してきたと推測される。

アスパラガス属植物の系統関係に関しては、これまで、形態的な特徴による分類が1940年代より数多く研究されているが、研究者により分類の論争が見られる。1944年 Baileyは、アスパラガス属植物を *Euasparagus*、*Asparagopsis*、*Kodiastigma*、*Myrsiphyllum* の4 sectionに分類し、*A. officinalis*を含む *Euasparagus* は雌雄異株植物に分類し、それ以外の3 sectionを両性花植物に分類した。また、1987年 H.T.CliffordとJ.G.Conrannは、アスパラガス属植物を *Asparagus*、*Protasparagus*、*Myrsiphyllum* の3 sectionに分類し、雌雄異株植物である *A. officinalis* を *Asparagus* と分類し、それ以外の2 sectionを両性花植物に分類した。しかし、アスパラガス属植物の系統関係は、今なお、明白ではない。

そこで、本研究では、アスパラガス属植物は両性花植物から進化の過程で雌雄異株植物が分化してきたという推測を実証するために、まず、アスパラガス属植物の系統関係を調べる必要があると考え、その方法として、葉緑体DNAの制限

酵素切断断片長多型(RFLP)を用いた。RFLPは技術的に簡単であり、葉緑体DNAの変異度を速く評価できるという利点がある。そこで、まず、雌雄異株植物である食用アスパラガス (*Asparagus officinalis* L.cv.Mary Washington 500W) の葉緑体DNAの制限酵素地図を作成した。さらに、それを基にアスパラガス属植物葉緑体DNAの比較解析を行い、将来、性分化の機構を解明する基点とするためにそれらの系統関係を追究した。

第2章 食用アスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) 葉緑体DNAのクローニング及び制限酵素切断地図

RFLPの方法でアスパラガス属葉緑体DNAの構造解析を行うのにそれぞれの種より全DNAを抽出し、イネ葉緑体DNAをプローブに用いてサザンハイブリダイゼーションしたが、その場合、核DNA及びミトコンドリアDNAとも相同性のある部分が発色してくる可能性があり、そのような誤差をなくすためには、アスパラガス属植物の一種で葉緑体DNAの制限酵素切断地図を作る必要があると考えられる。そこで雌雄異株植物である食用アスパラガス (*Asparagus officinalis* L.cv.Mary Washington 500W) の葉緑体DNAの制限酵素切断地図を作成した。播種後、1ヶ月の植物体から採取した仮葉からショ糖不連続密度勾配遠心で葉緑体を分画し、葉緑体DNAを抽出した。その葉緑体DNAを制限酵素BamHI, PstI, SalI, HindIII及びPstI+SalIで完全に切断した後、アガロースゲル電気泳動で分離した結果、Fig.1及びTable1のように断片が分かれた。各断片の長さを合計すると平均約155kbpであった。この葉緑体DNAの制限酵素切断地図を作成するために、まず、葉緑体DNAを制限酵素HindIII及びXhoIで完全に消化し、それぞれプラスミドベクターpUC119及びファージベクターλ DASHIIにクローニングを行い、全体の約70%の領域をカバーするクローンを得た。各クローンが葉緑体DNAのクローンであることを確認するために、ホウレンソウから抽出した葉緑体DNAをプローブに用いて、サザンハイブリダイゼーションをすることにより確認した。このようにして得られたアスパラガス葉緑体DNAのクローンをHindIIIで切断し、アガロースゲル電気泳動をした結果をFig.2に示した。そして、これらのクローン及びイネ葉緑体DNAのクローンを用い、食用アスパラガス葉緑体DNAの制限酵素地図を作成した (Fig.3A)。その結果、アスパラガス葉緑体DNAの全長は約155kbpで、約23kbpの逆位反復配列が一組存在することが分かった。さらに、15種類の遺伝子の位置を決定して他の植物と比較したところ、双子葉植物のタバコ及びアスパラガスと同じユリ科のタマネギと遺伝子の配

列が同じで、イネ科植物の葉緑体DNAの特徴である*rpoB/C* 遺伝子付近の大きな逆位は見られなかった (Fig.3B)。

第3章 アスバラガス属植物葉緑体DNAの比較解析

次に、アスバラガス属植物葉緑体DNAの制限酵素切断パターンを比較することにより、アスバラガス属植物の種間の葉緑体DNAの変異度を調べることが可能になり、種間の近遠縁関係を知ることが出来、アスバラガス属植物の系統関係の基本データになると考え、アスバラガス属植物葉緑体DNAの比較解析を行った。アスバラガス属植物の中の3種の雌雄異株植物である (*A. officinalis*, *A. cochinchinensis*, *A. schoberioides*) と5種の両性花植物である (*A. asparagoides*, *A. sprengeri*, *A. falcatus*, *A. virgatus*, *A. plumosus*) を用いて、アスバラガス属植物間における葉緑体DNAの変異を調べた。まず、8種のアスバラガス属植物の仮葉より全DNAを抽出して制限酵素HindIIIとXhoIで切断し、アスバラガスとイネの葉緑体DNA由来のプロープを用いてサザンハイブリダイゼーションを行い、アスバラガス属植物葉緑体DNAのHindIIIとXhoIの制限酵素切断地図を作成した (Fig.4, 5)。その結果、制限酵素HindIIIとXhoIの葉緑体DNAの切断パターンは非常によく似ていることが分かった。その中で変異が見られたところは、雌雄異株植物である*A. cochinchinensis*においてのみ、イネ葉緑体DNA由来のPstI-1断片をプロープに用いたときに約0.9kbpの欠失がみられた。また両性花の植物である*A. asparagoides*, *A. sprengeri*, *A. falcatus* では、イネ葉緑体DNA由来のPstI-1断片をプロープに用いたときに他の種と比べ、1ヶ所に変異が見られた。

第4章 葉緑体DNAのRFLPからみたアスバラガス属植物の系統関係

高等植物を材料としたRFLPの研究では、葉緑体DNAがよく用いられる。それは葉緑体DNAが、核DNA、ミトコンドリアDNAに比べ以下のような利点を持つからである。1) 塩基置換速度が核DNAと比べて2-3倍遅い。2) 欠失・挿入・逆位その他の構造変化がごくまれにしか起こらない。3) 母性遺伝 (裸子植物では父性遺伝) なので、1個体が1種類のゲノムだけを持つ。4) 1細胞あたり2000-3000コピーも存在し、含量が多い。5) 適当な大きさ (通常135-160kb) である。6) ゲノムあたり1種類の遺伝子は1種類のみで、遺伝子族を形成していない。本研究ではこのRFLPの方法を用い、アスバラガス属植物葉緑体DNAの制限

酵素切断パターンを比較し、それらの系統関係を調べた。

まず、RFLPの分析によりアスパラガス品種間及びアスパラガス属植物の葉緑体の系統関係を調べられるか検討するために、*A. officinalis*の6品種、Mary Washington 500W, Million, UC157, Hokkai 100, Goldschatz, 全雄のFruit とアスパラガス属植物である*A. officinalis*, *A. plumosus*, *A. scandens*の3種を用いて調べた。それらの植物の仮葉から全DNAを抽出し、制限酵素HindIII, BamHI, EcoRI, XhoI, PstI+Sallで消化し、イネ葉緑体DNAの全断片をプローブに用いてサザンハイブリダイゼーションした。Fig.6は、HindIIIとBamHIの結果を示している。その結果、食用アスパラガスの品種間には差が見られなかった。一方、アスパラガス属植物の葉緑体DNAのバンドパターンも非常に類似していた。したがってこれらの葉緑体DNAのバンドパターンのみの比較では系統関係を調べるのが難しいと判断し、制限酵素とプローブの数を増やし、食用アスパラガス (*Asparagus officinalis* L. cv. Mary Washington 500W) 葉緑体DNAの制限酵素地図をもとにして、*A. officinalis*を含むTable2に示した10種13系統の葉緑体DNAの制限酵素切断パターンを比較することにより、これらの系統関係を明らかにした。これらの植物の仮葉から全DNAを抽出し、12種類の制限酵素BamHI, BglII, ClaI, EcoRI, EcoRV, HindIII, KpnI, SacI, Sall, SmaI, PstI, XhoIで切断し、アスパラガスとイネの葉緑体DNA由来の6種類のプローブを用い、67の組み合わせ [EcoRIはイネの葉緑体DNA由来のPstI-1 (*rbcL*から*petD*遺伝子までを含む)のみ] でサザンハイブリダイゼーションを行い、種間でバンドパターンを比較し、葉緑体DNAの変異を調べた(Fig.7, 8)。この結果で解析に用いた6種類のプローブを合わせると約60kbpでアスパラガス葉緑体DNAの約40%をカバーする。その中でイネ葉緑体DNA由来のPstI-1断片をプローブに用いたときに最も変異が大きかった。この結果をもとに、1979年NeiとLiの方法で各系統間のバンドパターンの差異率にもとづき塩基置換変異度を求め (Table3)、UPGMA法によりアスパラガス属植物の系統樹を作成した(Fig.9)。この系統樹を形態的な特徴から分類したH.T.CliffordとJ.G.Conrannの分類 (1987) と比較したところ非常によく一致することが分かった。

結 語

本研究はアスパラガス属植物が雌雄異株植物から進化の過程で両性花植物に分化してきたか、あるいは、両性花植物から進化の過程で雌雄異株植物に分化してきたかの方向を明確にさせ、将来、性分化の特性を追究する基点とするために、

葉緑体DNAの構造解析による系統分類を試み、以下の結果が得られた。

1) 食用アスパラガス葉緑体DNAを抽出し、プラスミドベクターpUC119及びファージベクターλDASHIIにクローニングし、制限酵素地図を作成した結果、全長は約155kbで約23kbpの逆位反復配列が一組存在することが分かった。さらに15種類の遺伝子の位置を決定して他の植物と比較したところ、双子葉植物のタバコ及びアスパラガスと同じユリ科のタマネギと遺伝子の配列が同じで、イネ科植物の葉緑体DNAの特徴である*rpoB/C*遺伝子付近の大きな逆位は見られなかった。

2) 食用アスパラガス葉緑体DNA制限酵素切断パターンを基にアスパラガス属植物葉緑体DNAを比較した結果、制限酵素HindIIIとXhoIの葉緑体DNAの切断パターンは非常によく似ていることが分かった。しかし、雌雄異株性植物である*A. cochinchinensis*には約0.9kbpの欠失があり、両性花の植物である*A. asparagoides*, *A. sprengeri*, *A. falcatus*は1ヶ所に変異が見られた。この結果は他の植物と比べ、アスパラガス属葉緑体DNAの変異は極めて少ないことから、アスパラガス属植物は比較的近縁な種によって構成されている属であると考えられる。

3) 葉緑体DNAの制限酵素切断パターンから、アスパラガス属植物の系統関係を調べた結果、形態的な特徴から分類したH.T.CliffordとJ.G.Conrannの分類(1987)と非常によく一致することがわかった。さらに、その系統樹からアスパラガス属植物の雌雄異株植物は両性花から単系統で分化してきたと考えられる。

以上の結果より、アスパラガス属植物の雌雄異株植物は両性花から単系統で分化してきたと考えられる。しかし、アスパラガス属植物以外の近縁植物を入れてなかったためそれらの進化の方向をきめることは出来なかった。今後、アスパラガス属植物及びその近縁の植物を加え、葉緑体DNA上の特定の遺伝子(*matK*など)の塩基配列を比較して系統樹を作成することによってアスパラガス属植物の雌雄異株植物の起源とその進化の方向がより一層明確になるものと期待される。さらに、将来、性決定遺伝子がクローニング出来れば、系統樹上で雌雄異株植物と両性花植物を含む植物種において性分化がどのようにして起こったのかが解明される事も期待される。

Fig.1 Restriction fragment patterns of asparagus ctDNA generated by single digestion with BamHI (lane 2), PstI (lane 3), Sall (lane 4), HindIII (lane 5), and PstI+Sall (lane 6). Lane 1 shows molecular weight marker of λ DNA digested with HindIII.

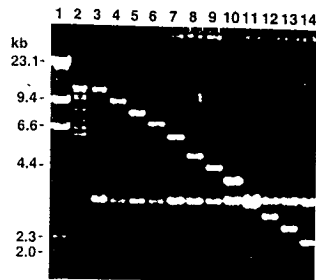
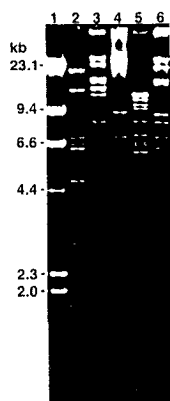


Fig.2 Clone bank of ctDNA from *Asparagus officinalis* L. The clones and ctDNA were digested with HindIII and subjected to electrophoresis on a 0.7% agarose gel. Lane 1, molecular weight marker of λ DNA digested with HindIII; lane 2, chloroplast DNA of *Asparagus officinalis* L. digested with HindIII; lane 3-14, plasmid clones of the ctDNA from *Asparagus officinalis* L.

Table 1 Molecular size of restriction fragments of asparagus ct DNA generated by digestion with BamHI, PstI, Sall, HindIII, and XhoI

BamHI		PstI		Sall		HindIII		XhoI	
Frag.	kb	Frag.	kb	Frag.	kb	Frag.	kb	Frag.	kb
B1	21.0	P1	34.0	S1	80.0	H1	13.0(2)	X1	27.5
B2	13.5	P2	24.0	S2	36.0	H2	11.5	X2	22.0
B3	7.1	P3	17.0	S3	22.0	H3	10.0(2)	X3	16.0
B4	6.6	P4	16.0	S4	9.1	H4	9.4	X4	13.0
B5	6.2(2)	P5	14.0(2)	S5	7.1	H5	8.2	X5	9.8
B6	5.7	P6	13.0	S6	0.8	H6	7.4	X6	9.1(3)
B7	5.1	P7	8.2	S7	0.7	H7	6.6	X7	6.5
B8	5.0	P8	4.9			H8	6.4	X8	4.9
B9	4.7(2)	P9	2.7			H9	5.8(2)	X9	4.4(2)
B10	4.2	P10	2.5			H10	5.1	X10	3.2
B11	4.1	P11	2.3			H11	4.6	X11	3.0(2)
B12	3.5	P12	1.3			H12	4.4	X12	1.8
B13	3.0(2)	P13	1.0			H13	3.9(2)	X13	1.5(2)
B14	2.9(4)					H14	3.1(2)	X14	1.3(2)
B15	2.4					H15	2.9	X15	1.0(3)
B16	2.3					H16	2.4		
B17	2.2(2)					H17	2.1		
B18	1.9					H18	1.8		
B19	1.6(6)					H19	1.7		
B20	1.4(2)					H20	1.3(3)		
B21	1.3(2)					H21	1.2		
B22	1.1(3)					H22	1.1(3)		
B23	1.0(3)					H23	0.7		
B24	0.9(2)								
B25	0.8(4)								
B26	0.7(3)								
Total	154.4	154.9		155.7		155.2		155.4	

Fig.3A Linear physical map of asparagus ctDNA showing the restriction sites of five endonucleases, namely, BamHI, PstI, Sall, HindIII and XhoI. Long heavy lines over the map indicate locations of inverted repeats (IR) and the genes are indicated by short heavy lines.

B Comparison of the order of ctDNA fragments from tobacco, asparagus, and rice.

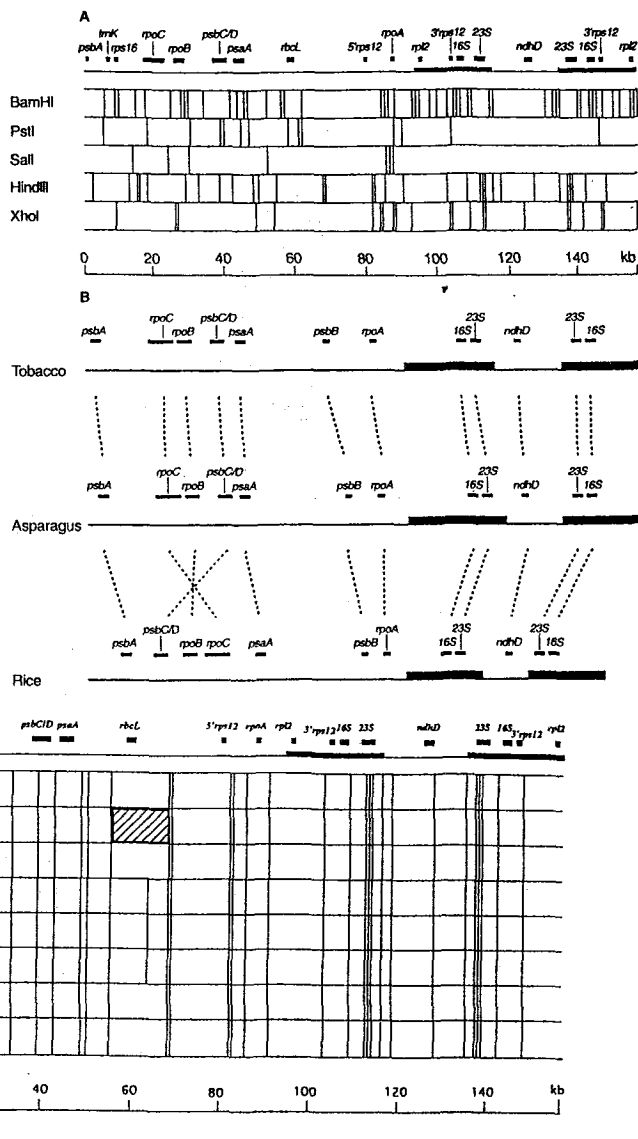


Fig.4 Comparison of Physical map of genus *Asparagus* ctDNA among *A. officinalis*, *A. cochinchinensis*, *A. schoberioides*, *A. asparagoides*, *A. sprengeri*, *A. falcatus*, *A. virgatus*, *A. plumosus* in a linear from showing restriction sites of endonuclease HindIII. Long bold lines over the map indicate locations of inverted repeats (IR). Gene orders are described by short bold lines.

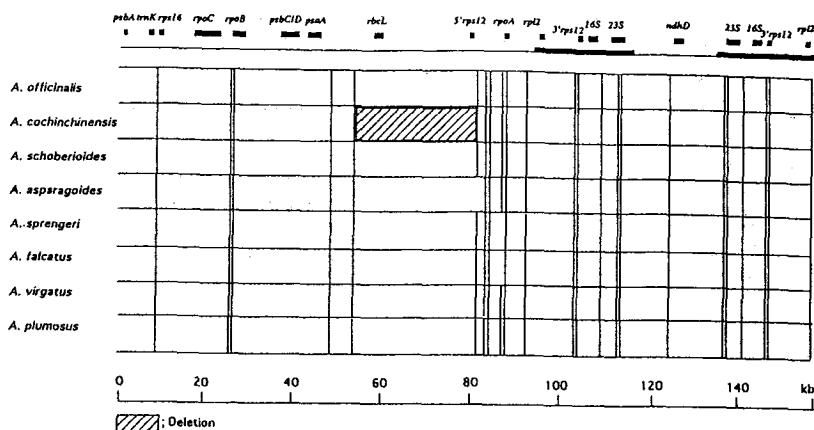


Fig.5 Comparison of Physical map of genus *Asparagus* ctDNA among *A. officinalis* *A. cochinchinensis* *A. schobertoides* *A. asparagoides* *A. sprengeri* *A. falcatus* *A. virgatus* *A. plumosus* in a linear from showing restrictions sites of endonuclease XhoI. Long bold lines over the map indicate locations of inverted repeats (IR). Gene orders are described by short bold lines.

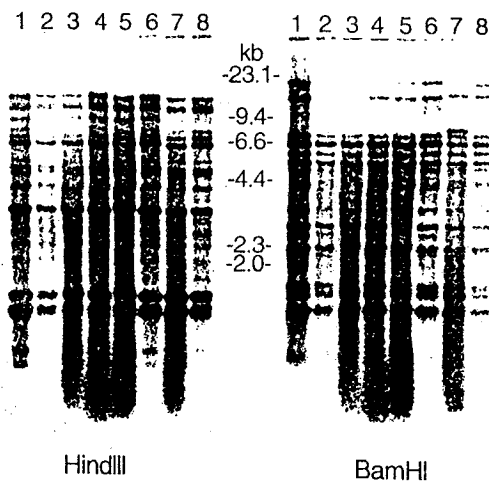
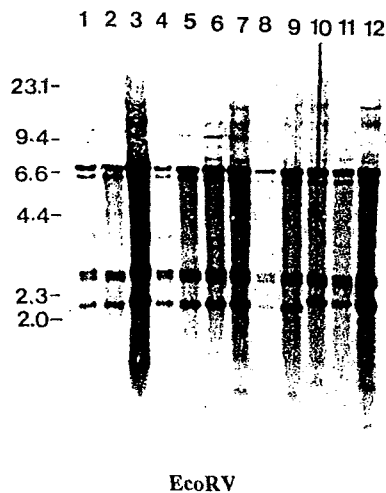


Fig.6 Southern blot analysis of total DNA from variations of *Asparagus officinalis* (lanes 1-6) and *Asparagus* species (lanes 7 and 8) with all the cloned fragments of rice ctDNA as probe. The restriction enzymes used were HindIII and BamHI. 1) *A. officinalis* var. Mary Washington 500W 2) var. Million 3) var. UC157 4) var. Hokkai 100 5) var. Goldschatz 6) var. Fruit 7) *A. plumosus* var. pyramidalis 8) *A. scandens*.

Table 2. *Asparagus* species used in the present study

<i>Asparagus</i> species	Dioecious/ ¹ Hermaphrodite	Chromosome number(2n)	Center of origin
<i>A. asparagoides</i> (<i>A. medeoloides</i>)	H	20	South Africa
<i>A. cochinchinensis</i>	D	20	China, Japan, Korea(d) ²
<i>A. falcatus</i>	H	20/40	Tropical Asia, Sri Lanka, South Africa
<i>A. macowanii</i>		20	South Africa
<i>A. officinalis</i>	D	20	South Africa South Europe, England, South Russia
var. Mary Washington 500W			
var. Goldschatz			
var. UC157			
<i>A. plumosus</i>	H	20	South Africa
var. nanus			
var. pyramidalis			
<i>A. scandens</i>	H	20	South Africa
<i>A. schoberioides</i>	D	20	China, Japan, Korea(d) ²
<i>A. sprengeri</i>	H	60	Natal (South Africa)
<i>A. virgatus</i>	H	20	South Africa

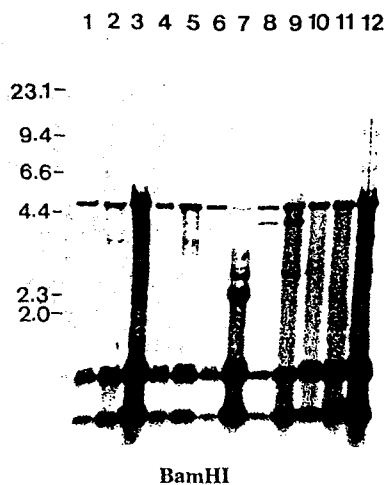
¹ D ; Dioecious, H ; Hermaphrodite,
² d ; distribution



EcoRV

Fig. 7 Southern blot analysis of total DNA from *Asparagus* species, using rice probes.

1) *A. cochinchinensis* 2) *A. officinalis* var. Mary Washington 500W3) *A. officinalis* var. Goldschatz 4) *A. officinalis* var. UC157 5) *A. schoberioides* 6) *A. scandens* 7) *A. asparagoides* 8) *A. falcatus* 9) *A. macowanii* 10) *A. plumosus* var. nanus 11) *A. plumosus* var. pyramidalis 12) *A. virgatus*



BamHI

Fig. 8 Southern blot analysis of total DNA from *Asparagus* species, using *A. officinalis* probes.

1) *A. cochinchinensis* 2) *A. officinalis* var. Mary Washington 500W3) *A. officinalis* var. Goldschatz 4) *A. officinalis* var. UC157 5) *A. schoberioides* 6) *A. scandens* 7) *A. asparagoides* 8) *A. falcatus* 9) *A. macowanii* 10) *A. plumosus* var. nanus 11) *A. plumosus* var. pyramidalis 12) *A. virgatus*

Table. 3 Chloroplast DNA RFLP and nucleotide sequence divergence among genus *Asparagus* of nine species

	<i>A.off</i>	<i>A.sch</i>	<i>A.fal</i>	<i>A.plu</i>	<i>A.sca</i>	<i>A.asp</i>	<i>A.vir</i>	<i>A.mac</i>
<i>A. officinalis</i>	—	159/329	154/329	151/332	159/335	154/333	154/329	154/327
<i>A. schoberioides</i>	0.0057	—	157/330	154/334	160/336	158/331	151/331	157/330
<i>A. falcatus</i> , <i>A. sprengeri</i>	0.0110	0.0083	—	145/333	156/330	155/331	147/332	161/330
<i>A. plumosus</i>	0.0158	0.0135	0.0230	—	146/333	145/333	160/334	144/333
<i>A. scandens</i>	0.0087	0.0081	0.0093	0.0219	—	155/331	145/331	154/330
<i>A. asparagoides</i>	0.0130	0.0077	0.0109	0.0230	0.0109	—	145/332	155/331
<i>A. virgatus</i>	0.0110	0.0153	0.0203	0.0071	0.0220	0.0225	—	144/331
<i>A. macowanii</i>	0.0100	0.0083	0.0041	0.0242	0.0115	0.0110	0.0232	—

Above the diagonal ; number of common fragment/total number of fragment

Below the diagonal ; nucleotide sequence divergence(p) values

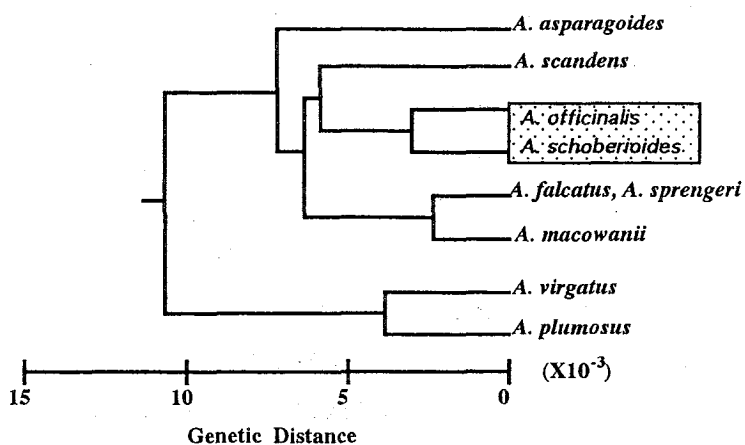


Fig. 9 A dendrogram of *Asparagus* species based on UPGMA analysis of chloroplast DNA nucleotide sequence divergence.

論文審査の要旨

本研究は、アスパラガス属が進化の過程で、雌雄異株植物から両性花植物に分化してきたか、あるいは、両性花植物から雌雄異株植物に分化してきたかの方法を明確にさせ、将来、性分化の機構を追究する基点とするために、葉緑体DNAの構造解析による系統分類を試みたものである。

まず、食用アスパラガス (*Asparagus officinalis*) の葉緑体DNAの制限酵素地図を作成したところ、全長は約155kbで約23kbpの逆位反復配列が一組存在することがわかった。さらに、15種類の遺伝子の位置を決定し、他の植物と比較し、双子葉植物のタバコ、及び、アスパラガスと同じユリ科のタマネギと遺伝子の配列が同一で、イネ科植物の葉緑体DNAの特徴である *rpoB/C* 遺伝子付近の大きな逆位がないことを明らかにした。

次に、上記の制限酵素地図を基にアスパラガス属植物葉緑体DNAを比較したところ、制限酵素Hind III と Xho I の切断パターンは非常に類似していることがわかった。しかし、雌雄異株植物である *A. cochinchinensis* には約0.9kbpの欠失があり、両性花植物である *A. asparagoides*, *A. sprengeri*, *A. falcatus* には1ヶ所に変異がみられた。この結果から、他の植物と異なり、アスパラガス植物の葉緑体DNAの変異は極めて少ないことがわかり、アスパラガス属植物は比較的近縁な種によって構成されている属であることを指摘した。さらに、葉緑体DNAの制限酵素切断パターンから、アスパラガス属植物の系統関係を調べた結果、従来の形態的特徴から分類した結果と非常によく一致することがわかった。また、その系統樹から、アスパラガス植物の雌雄異株植物は両性花から単系統で分化してきたことを明らかにした。

以上のように、本研究は、1) 食用アスパラガスの葉緑体DNAの制限酵素地図の作成 2) アスパラガス属植物葉緑体DNAの比較解析 3) 葉緑体DNAのRFLPからみたアスパラガス属植物の系統樹作成、によって、アスパラガス植物の雌雄異株植物は両性花から分化してきたという結論を導きだした。今後、アスパラガス属植物及びその近縁種の葉緑体DNA上の特定の遺伝子 (*matK* など) の塩基配列を比較することにより、アスパラガス属植物の雌雄異株植物の起源とその進化の方向が一層明確になるものと期待される。また、将来、性決定遺伝子が判明し、クローニング出来れば、系統樹上で雌雄異株植物と両性花植物を含む植物種において性分化がどのように起こったのが解明されることも期待される。よって、審査員一同は、本論文提出者は博士(農学)の学位を受けるに値するものと判定した。